

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

دانشکده علوم پایه گروه زیست شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه ی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی
ومولکولی

گرایش ژنتیک (M.Sc.)

عنوان:

بررسی کمی بیان و تکثیر ژنی زیر واحد RNA آنزیم تلومراز در بیماران
مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل در سالهای 90-91

استاد راهنما :

دکتر سید سعید حسینی اصل

استاد مشاور:

دکتر سید علی رحمانی

نگارش:

جمشید نوروزبریس

تابستان 1392

چکیده:

در قرن بیستم آدنوکارسینوم معده اولین علت مرگ ناشی از سرطان بوده است و اکنون نیز بعد از سرطان ریه دومین علت مرگ ناشی از سرطان است (43). این سرطان در مردان ایرانی شایعترین سرطان و در زنان ایرانی سومین سرطان پس از سرطانهای پستان و روده بزرگ می باشد. میزان ابتلا به سرطان معده در استان اردبیل در بالاترین سطح کشوری است و شیوع سرطان معده و مری را در مردان 49/1 در 100000 و در زنان 25/4 در 100000 نفر اعلام کرده اند (24). در سلولهای سرطانی فعالیت آنزیم تلومراز بالاست. تلومراز یک آنزیم DNA پلیمرز وابسته به RNA می باشد که توالی تلومری انتهای کروموزومها را سنتز میکند و باعث تکثیر نامحدود سلولها میشود.

تلومراز، یک آنزیم رونوشت بردار معکوس می باشد که از توالی RNA خود، بعنوان الگوی سنتز توالی تلومر، استفاده میکند. آنزیم تلومراز از دو جزء تشکیل شده است: پروتئین کاتالیتیکی به نام hTERT و توالی RNA به نام hTERC.

بیان زیر واحد hTR (hTERC) برای فعالیت تلومراز ضروری است و میزان بیان نیز تحت تاثیر میزان Amplification زیر واحد hTR در سطح DNA می باشد.

مواد و روشها:

در این آزمایش از 30 بیمار مبتلا به سرطانهای معده و مری در بیمارستان امام خمینی اردبیل و با روش آندوسکوپی نمونه برداری انجام شد و از این نمونه ها توسط ترایزول، RNA و DNA استخراج گردید و به کمک تکنیک Real-Time PCR و Real-Time RT-PCR، بیان کمی و تکثیر ژنی زیر واحد RNA آنزیم تلومراز اندازه گیری شد.

نتایج: در بیماران مبتلا به سرطان معده و مری Amplification و افزایش بیان hTR وجود دارد.

بحث: افزایش فعالیت آنزیم تلومراز رابطه مستقیمی با افزایش بیان hTR دارد.

واژه های کلیدی: سرطان معده و مری، تلومراز، hTERC، hTR Expression، hTR Amplification



Islamic Azad University

Ahar Branch

Master of Science Cellular and Molecular -Genetic Biology

Title:

**Quantitative Analysis of hTR Expression and hTR
Amplification in Patients Affected with Gastric and
Esophageal Cancer in Ardabil province**

Supervisor :

S. Saied HosseiniAsl (PhD)

Co- supervisor :

Ali rahmani (PhD)

By:

Jamshid Norouz Brees

summer 2013

فهرست

| | |
|---------|------------------------------------|
| 1..... | فصل اول: |
| 1..... | کلیات |
| 2..... | 1-1-1 سرطان |
| 2..... | 2-1-1 انواع سرطان : |
| 3..... | 2-1-1 سرطان معده: |
| 4..... | 2-2-1 علایم سرطان معده : |
| 5..... | 2-2-1 علایم سرطان مری : |
| 5..... | 4-2-1 ساختار معده : |
| 5..... | 5-2-1 پیشرفت سرطان معده : |
| 6..... | 6-2-1 انواع سرطان معده : |
| 7..... | 7-2-1 علل سرطان معده: |
| 12..... | 1-3-1 تلومر: |
| 15..... | 2-3-1 تلومر و ارتباط آن با سرطان : |
| 16..... | 3-3-1 ساختار تلومر: |
| 18..... | 4-3-1 پروتئین های تلومر: |
| 21..... | 1-4-1 تلومراز : |

| | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 23..... | hTERT1-5-1 (زیر واحد کاتالیتیکی تلومراز): |
| 25..... | 2-5-1 جایگاه ژن hTERT و سازماندهی آن : |
| 27..... | 3-5-1 پروتئینهای متصل شونده به hTERT : |
| 29..... | 4-5-1 تنظیم بیان ژن hTERT : |
| 29..... | 5-6-1 فعال سازی رونویسی hTERT : |
| 29..... | 6-5-1 تنظیم کننده های منفی رونویسی hTERT : |
| 30..... | 1-6-1 Alternative Splicing یا پیرایش متغیر : |
| 31..... | 2-6-1 Alternative splicing و سرطان : |
| 32..... | فصل دوم: مبانی نظری و پیشینه تحقیق..... |
| 33..... | 1-1-2 بخشهای اساسی تلومراز : |
| 34..... | hTR2-1-2..... Error! Bookmark not defined. |
| 39..... | 1-2-2 پروتئینهای متصل شونده به hTR : |
| 40..... | 1-3-2 تنظیم بیان ژن hTR : |
| 40..... | 1-1-3-2 تنظیم بیان ژن hTR از طریق رونویسی : |
| 41..... | 2-1-3-2 تنظیم بیان ژن hTR از طریق مسیر علامت دهی سلولی: |
| 42..... | 3-1-3-2 تنظیم بیان ژن hTR از طریق متیلاسیون: |
| 42..... | 4-1-3-2 تنظیم بیان ژن hTR از طریق شکل گیری مجدد کروماتین: |
| 43..... | 4-2-1 بیان مختصر پیشینه تحقیقات انجام شده در خارج از کشور : |
| 44..... | 2-4-2 بیان مختصر پیشینه تحقیقات انجام شده در داخل کشور: |
| 46..... | فصل سوم مواد و روشها..... |
| 47..... | 1-3-جامعه آماری و حجم نمونه : |
| 47..... | 1-2-3 مواد لازم برای استخراج RNA و DNA بافت :..... Error! Bookmark not defined. |
| 47..... | 2-2-3 مواد لازم جهت تخریب آلودگی DNA (DNase treatment) : |
| 48..... | 3-2-3 Polymerase Chain Reaction (PCR) مواد لازم برای انجام |

| | |
|---------|-----------------------------------------------------------|
| 48..... | PCR 4-2-3 واکنش |
| 48..... | 5-2-3 مواد لازم برای الکتروفورز: |
| 49..... | 6-2-3 مواد لازم برای ساخت RNA cDNA از توموری |
| 49..... | 7-2-3 Real Time PCR: مواد لازم برای انجام |
| 50..... | 3-3 وسایل مورد نیاز: |
| 50..... | 1-3-3 وسایل مورد نیاز جهت جمع اوری و نگهداری نمونه ها: |
| 50..... | 2-3-3 وسایل لازم جهت استخراج DNA و RNA |
| 51..... | 3-3-3 وسایل لازم جهت انجام واکنش Real time |
| 51..... | 4-3-3 وسایل لازم جهت تهیه ژل الکتروفورز آگاروز: |
| 51..... | 4-3-3 دستگاههای مورد استفاده: |
| 52..... | 5-3 روش کار: |
| 51..... | 1-5-3 موارد مهم در استخراج RNA |
| 53..... | 2-5-3 استخراج RNA از بافت توسط تریزول: |
| 54..... | 3-5-3 استخراج RNA از نمونه هایی با میزان بالاتر از 10 mg: |
| 54..... | 4-5-3 استخراج RNA از مقادیر کم بافت (1-10mg): |
| 55..... | 5-5-3 سنتز CDNA |
| 59..... | 6-5-3 Real time-PCR: |
| 59..... | 7-5-3 منحنی ذوب و پرایمر دایمرها: |
| 60..... | 8-5-3 پرایمر دایمرها: |
| 61..... | 9-5-3 Real time-PCR جهت بررسی بیان hTR و تشدید ژنی hTR: |
| 61..... | مواردی که در انتخاب پرایمرها لحاظ گردید عبارتند از: |
| 66..... | منابع |

فهرست جداول:

| | |
|------------------------------------------------------------|----|
| جدول 3-1) اجزای تشکیل دهنده ی یک واکنش PCR..... | 50 |
| جدول 3-2) شرایط دمایی PCR ژن GAPDH..... | 57 |
| جدول 3-3) توالی پرایمرهای GAPDH..... | 57 |
| جدول 3-4) شرایط دمایی سنتز CDNA..... | 58 |
| جدول 3-5) شرایط دمایی (TM) پرایمر و ژن hTR..... | 61 |
| جدول 3-6) نسبت غلظت پرایمرهای Forward و Revers ژن hTR..... | 62 |
| جدول 3-7) بهترین نتایج set up برای ژن hTR..... | 63 |

فهرست شکلها:

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| شکل 1-1: فرضیه دو مرحله ای پیری سلولی و نامیرایی..... | 13 |
| شکل 1-2: مشکل همانند سازی انتهای کروموزوم..... | 15 |
| شکل 1-3 ساختار تلومر..... | 17 |
| شکل 1-4: جایگاه کروموزومی ژن hTERT بر روی کروموزوم شماره 5..... | 25 |
| شکل 1-2: جایگاه کروموزومی ژن hTR بر روی کروموزوم شماره 3..... | 34 |
| شکل 2-2: ساختار پروتئین hTR انسان..... | 35 |
| شکل 1-4) نتایج set up ژن hTR در pcr معمولی..... | 66 |
| شکل 2-4) الکتروفورز ژل RNA جهت رویت الودگی DNA..... | 68 |
| شکل 3-4) الکتروفورز ژل GAPDH جهت رویت عدم الودگی DNA..... | 69 |
| شکل 4-4) توزیع سنی بیماران مبتلا به سرطان معده ومری..... | 69 |

شکل 4-5) درجه توموری بیماران مبتلا به سرطان معده و مری.....70

شکل 4-6) توزیع جنسی بیماران مبتلا به سرطان معده و مری.....70

شکل 4-7) میزان بیان hTR بیماران مبتلا به سرطان معده و مری.....71

شکل 4-8) میزان Amplification ژن hTR در بیماران مبتلا به سرطان معده و مری.....72

فصل اول:

کلیات

1-1-1 سرطان

سرطان یک بیماری ژنتیکی است که می‌تواند تغییرات را در عرض ژن‌های خاص نشان دهد، ولی در بسیاری از موارد بیماری ارثی نیست. در بیماری ارثی، نقص ژنتیکی در کروموزوم‌های والدین حضور دارد و به سلول تخم انتقال می‌یابد. در مقابل تغییرات ژنتیکی که منجر به سرطان می‌شود در DNA سلول سوماتیک در طول عمر فرد مبتلا روی می‌دهد. چون سلول‌های سرطانی به صورت کنترل نشده تکثیر می‌یابند نتیجه‌ی آن تومورهای بدخیمی است که به بافت‌های سالم اطراف هجوم می‌کنند. با رشد زیاد سلول‌ها، در حالی که تومور به صورت موضعی باقی بماند، بیماری معمولاً می‌تواند با عمل جراحی و خارج کردن تومور درمان شود. در مقابل تومورهای بدخیم تمایل به متاستاز دارند که در این حالت سلول‌ها وارد لنف یا رگ‌های خونی شده و در قسمت‌های متفاوت بدن پخش می‌شوند و ایجاد تومورهای ثانوی کشنده می‌کنند و از طریق عمل جراحی هم خارج نمی‌شوند.

1-1-2 انواع سرطان :

سرطان یک بیماری منفرد نیست، بلکه بسیاری از بیماری‌ها را شامل می‌شود. بیش از 100 نوع متفاوت سرطان وجود دارد. رده‌های اصلی سرطان‌ها بر حسب نوع سلولی عبارتند از:

کارسینوم: این نوع سرطان در پوست یا در بافت‌هایی آغاز می‌شود که سطوح اندام‌های داخلی را می‌پوشانند.

سارکوم: سرطانی است که در استخوان، غضروف، چربی، عضله، عروق خونی، یا سایر بافت‌های همبند یا پشتیبان آغاز می‌شود.

لوسمی: سرطانی که در بافت‌های خون‌ساز مانند مغز استخوان شروع می‌شود و باعث می‌شود شمار زیادی از سلول‌های خونی غیرطبیعی تولید شوند و به خون وارد شوند.

لنفوم و میلوم: سرطانی که در سلول‌های دستگاه ایمنی آغاز می‌شود.

سرطان‌های دستگاه عصبی مرکزی: سرطان‌هایی که در بافت‌های مغز و طناب نخاعی آغاز می‌شود.